

## Válasz Dr. Pénzes Zsolt bírálataira

Mindenek előtt köszönetet szeretnék mondani Dr. Pénzes Zsoltnak, amiért elvállalta dolgozatom bírálatait. Köszönöm az alapos munkát, amit befektetett a dolgozat alapos áttanulmányozásába. Külön köszönöm az építő kritikát, és a segítő szándékú megjegyzéseket. Nagyon örülök, hogy munkámat sokoldalúnak, eredményeimet pedig hiánypótlónak tartja. A továbbiakban pedig reagálni szeretnék a Bíráló megjegyzéseire, illetve válaszolok a feltett kérdésekre.

### Formai kritika:

A bírálónak igaza van, a latin fajneveket dőlt betűvel kell írni. A dolgozatban végig ilyen módon szerepelnek, bár gépelési hibaként esetleg előfordulhat az ellenkezője. A Bíráló valószínűleg a címsorokban normál betűvel szereplő fajnevekre gondolt. Ahol ugyanis a címsort olyan módon különböztettem meg a szövegtől, hogy dőlt betűvel írtam, ott a latin fajnevek valóban normál betűvel szerepelnek, hogy eltérjenek a cím többi részétől.

### Megjegyzések:

#### 1.bekezdés:

Egyetértek a Bírálóval abban, hogy a populációk változatosságának időbeli dinamikája meghatározó a ma tapasztalható genetikai struktúra kialakulásában. Általánosságban azzal is egyetértek, hogy az enzim polimorfizmus csak korlátozott mértékben alkalmas a populációk történeti múltjának a tanulmányozására (lásd T. Schmitt és J. Habel számos tanulmányát). Emellett úgy vélem, hogy a történeti múlt szerepe egy régió genetikai struktúrájának a kialakításában erőteljesen függ a kérdéses földrajzi régió méretétől. Ha európai, vagy pláne palearktikus skálán vizsgáljuk a genetikai variabilitás mintázatát, akkor a történeti múlt szerepe alapvető fontosságú (pl. Gratton et al. 2008: a *Parnassius mnemosyne* európai populációi; Ritter et al. 2013: a *Phengaris (Maculinea) teleius* és a *P. nausithous* palearktikus populációi). Kisebb földrajzi skálán azonban a genetikai változatosság jelenlegi szerkezetének kialakításában jelentős szerepe van a közeli múlt evolúciós eseményeinek, mint a szelekció, a genetikai sodródás, vagy a génáramlás. A dolgozat legtöbb tanulmányában a fajok Kárpát-medencei populációit vizsgáltuk, sőt néhány faj esetében a vizsgált minták még ennél is szűkebb területről származtak: az *Arícia artaxerxes issekutzi* esetében például a Bükk-hegységből és az Aggteleki karsztról, az *Euphydryas maturna* egyik vizsgálata során pedig a Nyírségben található Fényi-erdő 2 szubpopulációjából. Ilyen korlátozott földrajzi léptékben, ahol a genetikai struktúrát nagyrészt a közeli múlt folyamatai határozzák meg, a változatosság mintázata jó eséllyel tanulmányozható az enzimpolimorfizmus segítségével. Ugyanakkor a komplex vizsgálatok eredményei arra is rávilágítottak, hogy az olyan, viszonylag nagyobb földrajzi léptékű vizsgálatokban, mint a *Parnassius mnemosyne* populációk elemzése (E.3.1. fejezet), ahol a minták túllépték a Kárpát-medence területét, az enzimlokuszokon tapasztalt genetikai struktúra alapján levonható következtetésekkel óvatosnak kell lenni. Ebben a tanulmányban például az Északi- és a Dunántúli-középhegység, valamint a Körös-vidéki populációk genetikai struktúrájának az értelmezése pusztán az enzimpolimorfizmus eredményei alapján, a mtDNS szekvenciák elemzése nélkül, könnyen vezethetett volna téves következtetésre.

## 2. bekezdés:

Az enzimlokuszok neutralitásának a kérdése mindig is erősen vitatott terület volt a szakirodalomban. Erről írtam is pár mondatot a dolgozat I.1.2. fejezetében. Közismert, hogy néhány fajban egyértelműen demonstrálták a szelekció hatását egyes enzim lokuszokon. Ugyanakkor a populációk genetikai vizsgálatánál alkalmazott 16-18 enzim lokusz vonatkozásában nem lehet egységes megállapítást tenni azok neutralitását illetően. A kérdéssel kapcsolatos véleményem a flux-elméleten alapul. Ezt az elméletet Dykhuizen et al. dolgozta ki még 1987-ben. A flux elmélet lényege, hogy a metabolikus folyamatok (klasszikus példa az alkohol lebontás folyamata:  $\text{alkohol} \rightarrow \text{CO}_2$ ) egyes lépései, és így az őket katalizáló enzimek nem állnak közvetlenül kapcsolatban a fitnesszel. A rátermettséget a teljes metabolikus út sebessége (a flux) befolyásolja. A fluxra azonban kevésbé hatnak az egyes rész lépéseket katalizáló enzimek alternatív változatai még akkor is, ha ezek a változatok eltérő katalitikus sajátságúak. Ugyanakkor a flux is szabályozás alatt áll, ami általában az egyik enzimatis lépésen keresztül valósul meg. Amennyiben annak az enzimnek, amely ebben a folyamatban szerepel vannak eltérő katalitikus hatású változatai, akkor ezeknek a genetikai változatoknak lehet eltérő a rátermettsége. A *Drosophila melanogaster* esetében például az alkohol lebontása során a flux szabályozása az első lépésben valósul meg, amikor az alkohol dehidrogenáz hatására az etanol először aldehiddé, majd acetil-koenzim A-vá alakul. Így nem meglepő, hogy ez az enzim egyike azoknak, melyen részletesen tanulmányozták a szelekció hatását (Van Delden et al. 1982).

Ugyanakkor a Bírálónak igaza van abban a tekintetben, hogy a genetikai adatok feldolgozására használt statisztikai programok a lokuszok neutralitását feltételezik. Azt, hogy a szelekciónak kitett lokuszok befolyásolják a populációk genetikai struktúráját a mi vizsgálataink alapján is alá tudom támasztani. Az E.2.1. fejezetben írtam le a *Maculinea alcon* és *M. teleius* populációkkal kapcsolatos eredményeinket. A differenciálódás mértéke jelentősen magasabb volt a *M. alcon*, mint a *M. teleius* populációkban. A jelenség elemzése során mindkét fajban elvégeztük a kiugró differenciálódást mutató lokuszok analízisét. A *M. alcon* populációkban 4 enzim lokusz esetében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb differenciálódást a migráció-drift egyensúlya alapján várhatóánál. A továbbiakban PCA segítségével összehasonlítottuk a populációk genetikai mintázatát az „outlier” és a neutrális lokuszok alapján. A hangyagazda szerinti elkülönülés egyértelmű volt a feltehetően diverzifikáló szelekciónak kitett „outlier” lokuszok esetében, míg a neutrális lokuszok alapján semmilyen mintázat nem mutatkozott a populációk differenciálódásában.

Az enzim lokuszok neutralitására vonatkozó dilemmának azonban van egy harmadik vonatkozása is. A DNS technikák alkalmazása során ritkán merül fel a neutralitás kérdése. Különösen a mikroszatelliteket vagyunk hajlamosak eleve neutrálisnak tekinteni. Li et al (2002) egy összefoglaló cikkben tekintette át a mikroszatellitek genombeli elhelyezkedését, és lehetséges funkciójukat. Megállapították, hogy a mikroszatellitek döntő hányada a genom nem kódoló régiójában található, ami alátámasztja neutrális voltukat. Egyedül azoknak a mikroszatelliteknek fordul elő relatíve magasabb hányada a kódoló régióban, melyeknek 3 bázisból áll az alapszekvenciája. Ugyanakkor az önmagukban neutrális mikrosatellit lokuszokon is érvényesülhetnek szelekciós hatások a „hitchhiking effect” következtében. Egyrészt szoros kapcsoltságban állhatnak direkcionális szelekciónak kitett lokuszokkal (szelekciós seprű) mint ahogy azt a *Plasmodium falciparum* esetében Nair et al. (2003) kimutatta. Másrészt viszont a mikroszatellitek olyan kis méretűek, hogy akár gének intronjaiban is előfordulhatnak. Ha a kérdéses génen szelekciós hatások érvényesülnek, akkor

annak következményei a mikroszatellit lokuszon is jelentkeznek. Ezt tapasztalta Luikart et al. (2008) a vastagszarvú juh kanadai populációiban. Más DNS markereknél is ismertek a szelekciós hatások. A kiugró lokuszok vizsgálata során például az első munkákban AFLP markereket használtak. Amikor több száz AFLP lokusz segítségével elemeztek különböző ökotípusokat, mindig akadt legalább 3-5 olyan lokusz, amely a neutrális folyamatok alapján vártnál szignifikánsan magasabb differenciálódást mutatott. Ezek alapján tehát bármely marker neutralitása megkérdőjelezhető, bár kétségtelen tény, hogy az enzim lokuszok kapcsán ez a kérdés gyakrabban merül fel.

### 3. bekezdés:

A 3. bekezdés vonatkozásában csak részben értek egyet a Bírálóval. Kétségtelen tény, hogy a genetikai változatosság struktúrájának elemzése alapján csak következtetni tudunk a háttér folyamatokra, amik eredményeként létrejött ez a struktúra. Ugyanakkor a genetikai adatokon túlmenően sok faj életmenetéről, szaporodási stratégiájáról, esetleg egy adott habitatban bekövetkező változásról van ismeretünk. Ezek a háttérinformációk kiválóan alkalmasak arra, hogy null-hipotéziseket állítsunk fel a legvalószínűbb evolúciós hatásokra nézve és ezek alapján kialakítsunk egy elméletet a várható eredményeket illetően. Ezen a gondolatmeneten alapult a 10 esettanulmányból 5, melyekben a genetikai sodródás, a beltenyészet és a lokális adaptáció genetikai következményeit tanulmányoztuk. Ebben az 5 esettanulmányban az enzim polimorfizmus vizsgálata során kapott eredmények alátámasztották előzetes hipotézisünket. Ugyanakkor tisztában vagyok az enzimek molekuláris markerként való alkalmazásának a korlátaival. Ezeket a problémákat a dolgozatban is kifejtettem az I.1.2. fejezetben. Jóllehet az itt említett 5 esettanulmány eredményei azt mutatják, hogy a maga korlátaiban belül az enzim polimorfizmus is sikeresen alkalmazható bizonyos kérdések megválaszolására.

A Bíráló fixációs indexre vonatkozó megjegyzésére válaszolva azt tudom mondani, hogy a populációk struktúrájának az analízisében egyik tanulmányban sem egyetlen módszert alkalmaztam. A fixációs indexek megállapítása része volt ugyan az elemzéseknek, de a genetikai differenciálódás hierarchikus mintázatát nem az  $F_{ST}$  értékek alapján tártam fel. Minden olyan tanulmányban, ahol a populációk genetikai struktúráját vizsgáltam, két analízist alkalmaztam a hierarchikus struktúra felderítésére: a Bayes-féle klaszterezési módszert és a főkomponens analízist. Ezeknek az analíziseknek az eredményei alapján körvonalazódott a populációk differenciálódásának a mintázata. A további statisztikai módszerek (így a fixációs indexek is) azt segítették elő, hogy megállapítsam, mennyire megbízható (több „statisztikai lábon álló”) ez a genetikai struktúra.

A további bekezdések kritikai megjegyzéseiben közös problémaként merült fel a pontatlan fogalmazás. Ezekkel a megjegyzésekkel nagyrészt egyetértek. Sajnos gyakran előfordul velem, hogy sarkosan fogalmazok, ami sokszor vezet pontatlanságra.

### 4. bekezdés:

Egyetértek a Bírálóval, valóban nem csak a struktúrgének variabilitása az evolúció nyersanyaga. A variabilitás fontos forrásai az epigenetikus allélok, a génexpresszió szabályozásának változatossága, valamint a gének közötti kölcsönhatások is.

Ebben a bekezdésben egy további kritikai megjegyzést tesz a Bíráló a mtDNS szekvenciák alkalmazhatóságáról a taxonok leszármazási kapcsolatainak a megállapításában. Teljesen egyetértek a kritikával, hiszen a különböző DNS szekvenciák nagyon változó hatékonysággal alkalmazhatók a leszármazási kapcsolatok becslésére. Ugyanakkor a dolgozatban, egyetlen

esettanulmánytól eltekintve (E.4.1. fejezet) nem is volt célkitűzés a taxonok leszármazási kapcsolatainak a megállapítása. Abban a 2 esettanulmányban, ahol az enzimpolimorfizmus adatainak elemzése mellett mtDNS szekvencia analízist is végeztünk (E.3.1 és E.3.2.) a *Parnassius mnemosyne*, illetve az *Euphydryas aurinia* Kárpát-medencei populációinak a negyedidőszaki dinamikáját elemeztük.

#### 5. bekezdés:

Vitatkoznék a Bíráló Összefoglaló fejezettel kapcsolatos kritikai megjegyzésével. Egyrészt a dolgozatban a legtöbb esettanulmányban kvalitatív analíziseket végeztem. Felállítottam egy tesztelhető null hipotézist, és ennek az érvényességét állapítottam meg a vizsgálatok eredményei alapján. Az a tény, hogy a hipotézis érvényességének az alátámasztására számos, a populációgenetikai analízisekben széles körben elterjedt statisztikai módszert alkalmaztam, és több mutatót (polimorfizmus mutatói, differenciálódás mutatói) elemeztem, nem változtat azon az alapvető megközelítésen, hogy az egyes tanulmányokban egyszerű kérdésekre kerestem a válaszokat. Ebből adódóan az enzimlokuszokra vonatkozó eredmények is alapvetően kvalitatív jellegűek. Így természetesen a két idősíkon (történeti múlt és közeli múlt) ható evolúciós erők genetikai következményeinek az összehasonlítása is kvalitatív jellegű volt. A Bíráló által említett 110. oldalon tulajdonképpen azt fogalmaztam meg, hogy amíg a *Parnassius mnemosyne* Kárpát-medencei populációiban az enzim lokuszokon tapasztalt differenciálódási mintázat csak részben mutatott párhuzamot a mtDNS szekvencia adatok elemzése alapján feltáruulóval, addig a két marker alkalmazásával kapott eredmények párhuzamosak voltak az *Euphydryas aurinia* hasonló földrajzi léptékű populációiban.

#### 6. bekezdés:

Ebben a bekezdésben is több pontatlanságot említ a bíráló.

A palacknyak hatás nem vezet ugyan minden esetben allélkieséshez, de meglepően gyakran idézi elő a ritka allélok elvesztését. Ez különösen olyan markerek tanulmányozásával tárható fel, mint a mikroszatellitek, ahol egyes lokuszokon számos (10-15) allél is megjelenhet. Ez a jelenség az alapja a közelmúltban lezajlott palacknyak hatás statisztikai kimutatásának is (Luikart et al., 1998).

A genetikai differenciálódás és a drift kapcsolatát tekintve lehet hogy félreérthetően fogalmaztam, de azt szerettem volna kifejezni, hogy a sztochasztikus hatások, és így a genetikai sodródás minden populációban, az egyedek minden lokuszán folyamatosan érvényesül, ezért ennek a következményeivel (egy populáció rendszerben a genetikai differenciálódással) minden esetben számolni kell. Ehhez járulhatnak hozzá, és így növelhetik a differenciálódást további evolúciós folyamatok (pl. a diverzifikáló szelekció).

#### 7. bekezdés:

A polimorfizmus mutatóinak a standard hibáit illetően teljesen indokolt a kritika. Ugyanakkor a legtöbb tanulmányban alkalmaztam ANOVA-t a különböző földrajzi régiók, vagy más szempontból létrehozott populáció csoportok mutatóinak összehasonlítására. A következtetések alapjául azok az eredmények szolgáltak, melyek szignifikáns különbségeket mutattak a populáció csoportok között.

#### Kérdések:

1. A Lepidoptera fajok magas szintű enzimpolimorfizmusának genetikai hátterével közvetlenül foglalkozó tanulmányt nem találtam a szakirodalomban. Az enzimpolimorfizmus legátfogóbb meta-analízisét Nevo és munkatársai (1984) végezték el. Ebben a munkában több mint 1000 faj genetikai adatait elemezték, melyek között 170 rovarfaj szerepelt; a nappali lepkefajok száma pedig 42 volt. Az analízisben mindenekelőtt azt vizsgálták, hogy milyen mértékű a korreláció a polimorfizmus mutatói és különböző ökológiai faktorok között. Eredményeik közül a legjelentősebb a gerinctelen és a gerinces állat fajok polimorfizmusa között tapasztalt szignifikáns különbség volt, melyet a finom- és a durvaszemcsés környezet modelljével magyaráztak. Mivel a későbbi munkákban sem elemezték a Lepidoptera fajok polimorfizmusát a többi rovar fajhoz, vagy a gerinctelen taxonokhoz viszonyítva, ezért csak saját véleményemet tudom elmondani a kérdés kapcsán. A nappali lepkék magas szintű polimorfizmusában valószínűleg fontos szerepet játszik az a jelentős életmódbeli különbség, ami a lárvális és az adult életszakasz között megnyilvánul. A hernyók számos lepkefaj esetében (így az általunk vizsgáltaknál is) tápnövény specialisták, míg az adultak általában nektár fogyasztók, esetleg nemtáplálkoznak. A két életszakasz diszperziós képessége is jelentősen eltér, amennyiben a hernyók mozgásteret korlátozott, míg sok faj adultja akár nagy távolságokat is képes repülni. Nevo és munkatársai nyomán tehát a két életszakaszban az egyedek eltérően élnek meg a környezetüket. Míg a lárvális szakaszban a durvaszemcsés környezetben akár a populációkon belül, pl. egy metapopulációs hálózat szubpopulációi között is jelentős mértékű lehet a differenciálódás, addig az adultak intenzív migrációja következtében a populációk között is erős lehet a génáramlás. Ez a kettős hatás kialakíthat egy magas szintű polimorfizmust a nappali lepkék populációiban.

2. A dolgozatban szereplő esettanulmányokban alapvetően konzervációgenetikai kérdéseket elemeztem. Ezért a filogenetikai szakirodalom tekintetében csak részben tájékozódtam. Én nem találkoztam olyan publikációval, ami egyrészt több száz génre vizsgálta volna a Lepidoptera taxonokat, másrészt pedig olyannal sem, ami a Pillangószerűek öregcsaládjának (Papilionoidea) valamennyi nagyobb taxonját elemezte volna. A legtöbb filogenetikai munkában egyes családokon belül vizsgálták a leszármazási kapcsolatokat, mint például Wahlberg et al (2009) 10 gén régiója és 235 morfológia jelleg alapján elemezte a tarkalepkék családjának (Nymphalidae) 400 genuszát; Simonsen et al. (2010) a Papilionidae család 23 genuszában vizsgálta a leszármazási kapcsolatokat 7 gén szekvenciája alapján; Wahlberg et al (2014) 8 gén régiót vizsgált a Pieridae család valamennyi genuszában a leszármazási kapcsolatok megállapítására; Kawahara et al. (2018) 13 gén szekvenciáját alkalmazta a Hedilidae család 36 fajának az analízisének; stb. Ezekben a munkákban mindegyikben szerepelt a COI szekvencia is, mint egy gén a vizsgáltak között, de konszenzus fákat közöltek a cikkekben, és nem tértek ki a magi és a COI szekvencia alapján felállított fák különbségére.

3. A PCA eredmények robusztusságával kapcsolatban azt tudom mondani, hogy az első két tengely szinte minden vizsgálatban a variancia 45-50%-át magyarázta. A harmadik tengely pedig általában számottevően kisebb variancia hányadot magyarázott, mint a második. A Bíráló által kiemelt analízisben (a *Parnassius mnemosyne* Kárpát-medencei populációi esetében) például az 1. tengely önmagában a variancia 41,6%-át magyarázta meg, a 2. tengely 12,7%-ot, a 3. tengely 9,5%-ot, míg a 4. tengely 6,8%-ot. A tengelyek meghatározásában annyiban volt egyes lokuszoknak döntő szerepe, hogy 2-3 alléljuk esetében jelentősen magasabb volt a lineáris együttható értéke, mint a többi allélnél. A *P. mnemosyne* esetében például a *Pgm* lokusz 18 allélja közül háromnál volt kiugróan magas az együttható értéke. Ha

az analízist a *Pgm* lokusz adatainak elhagyásával végezzük, akkor az eredmények nagyon hasonlóak: (i) az 1. tengely a variancia 35,9%-át magyarázza, míg a 2. tengely 13,9%-ot; (ii) az első tengely meghatározásában a *Pgi* lokusznak van jelentős szerepe; (iii) a pontfelhők pedig az eredeti analízisnek megfelelően 4, többé kevésbé jól elkülönülő régiót mutatnak.

Új eredmények – 1. bekezdés:

A Bírálónak igaza van abban, hogy a genetikai variabilitás és az életmenet jellemzők közötti kapcsolat megállapítása általánosságban nem tekinthető új eredménynek. Ugyanakkor úgy érzem, hogy az a tény, hogy bizonyos esettanulmányokban (az *Aricia artaxerxes issekutzi* és a *Maculineaalcon* populációk variabilitásának összehasonlítása; a *M.alcon* lápréti ökotípusának és a *M. teleius* differenciálódási mintázatának értelmezése, vagy az *Euphydryasmaturna* finom populációszerkezetének a vizsgálata) az életmenet, vagy a szaporodási struktúra ismerete nélkül nem tudtuk volna értelmezni a genetikai változatosság szerkezetére kapott eredményeinket azt bizonyítja, hogy a fajok életmenet jellemzői nem egyszerűen kapcsolatban állnak genetikai struktúrájukkal, hanem annak egyik fontos meghatározói. Amikor a dolgozat Következtetések című fejezetének 108. oldalán úgy fogalmaztam, hogy az esettanulmányok között vannak olyanok, amelyek eredeti kérdésekre adnak választ, vagy sajátosan új szemszögből elemeznek egy problémát, akkor éppen erre a felismerésre gondoltam.

Remélem, hogy a Bíráló el tudja fogadni a kérdésekre és a megjegyzésekre adott válaszaimat. Még egyszer köszönöm a dolgozat értékelését és örülök, hogy a Bíráló fontosnak tartotta az egyes fajokra kapott eredményeimet és természetvédelmi relevanciájú következtetéseimet.

Debrecen, 2019. 01. 25.

Pecsenye Katalin